

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/77187 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01944

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Juni 2000 (13.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
299 09 998.9 12. Juni 1999 (12.06.1999) DE
200 05 992.0 4. April 2000 (04.04.2000) DE
200 07 494.6 26. April 2000 (26.04.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: ROITSCH, Thomas [DE/DE]; Königswiesen-
weg 18, D-93051 Regensburg (DE).

(74) Anwälte: GODDAR, Heinz usw.; Boehmert & Boehmert,
Franz-Joseph-Strasse 38, D-80801 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PROMOTER SYSTEM AND PRODUCTION AND USE OF THE SAME

(54) Bezeichnung: PROMOTORSYSTEM, DESSEN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acids that code for promoters and which are both tapetum-specific and pollen-specific, and to their use for producing male-sterile plants.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft für Promotoren codierende Nukleinsäuren, die sowohl tapetumspezifisch als auch pollenspezifisch sind, sowie deren Verwendung zur Erzeugung männlich steriler Pflanzen.

WO 00/77187 A2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Promotorsystem, dessen Herstellung und Verwendung

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Genexpression und deren Regulation in Pflanzen. Genauer betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuresequenz, die für einen Promotor codieren, diese umfassende Expressionssysteme, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Zellen, Pflanzen, von den Pflanzen erhältliche Samen und Verfahren zur Herstellung männlich steriler Pflanzen. Noch spezieller bezieht sich die Erfindung auf DNA-Promotor-Sequenzen und Expressionskassetten, die in Pflanzen eingeführt werden können, um die Transkription einer benachbarten kodierenden Sequenz zeitlich und räumlich innerhalb der Pflanzen zu regulieren.

Hintergrund der Erfindung

Ein Promotor ist eine DNA-Sequenz, die den Expressionsort und die Expressionsmenge eines Gens beeinflusst oder bestimmt und die Stellen für die Bindung der RNA-Polymerase zur Verfügung stellt. Die Position eines Promotors ist im Genom eines Organismus relativ zum Transkriptionsstartpunkt fixiert. Die RNA-Polymerase ist ein Enzym, das an den Promotor binden kann und die Transkription eines Gens vollzieht, das unter der Kontrolle dieses Promotors steht. Dabei entsteht die messenger-RNA (mRNA), die wiederum zur Synthese des Proteins verwendet wird.

Promotoren sind in verschiedenen Organismen untersucht worden. Für bestimmte Spezies konnten konservierte DNA-Bereiche (sog. Konsensus-Sequenzen) innerhalb von Promotoren gefunden werden, die mit verschiedenen Genen assoziiert sind. Von diesen Bereichen wird angenommen, daß sie in die Rolle, die der Promotor im Transkriptionsprozeß spielt, eingebunden sind. Die Initiation des Transkriptionsprozesses in Pflanzen schließt eine

Interaktion des Promotors mit der RNA-Polymerase II ein. Innerhalb von Pflanzenpromotoren wurden Konsensus-Sequenzen oberhalb des 5'-Endes des Transkriptionsstartpunktes gefunden. Eine dieser Sequenzen ist etwa 7 Basenpaare lang und befindet sich etwa 20-30 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstartpunktes. Diese Sequenz ist als sog. TATA-box bekannt und es wird angenommen, daß sie eine Rolle bei der RNA-Polymerase-Bindung spielt. Eine andere Sequenz mit einer Länge von ungefähr 9 Basenpaaren ist etwa 70-90 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstartpunktes zu finden. Diese Sequenz wird CAAT-box genannt und es wird angenommen, daß sie in der Regulation des Transkriptionslevels eine Rolle spielt. Es wurden noch andere Regionen oberhalb des Transkriptionsstartpunktes identifiziert, die die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation in Eukaryonten beeinflussen. Diese DNA-Bereiche, die Enhancer genannt werden, beeinflussen die Aktivität von Promotoren in ihrer Nachbarschaft. Diese Sequenzen sind jedoch der Definition nach keine Promotoren, da ihre Position nicht fixiert sein muß.

Um ein fremdes Gen in einem Organismus, z.B. einer Pflanze, exprimieren zu können, muß die kodierende Sequenz dieses Gens unter die Kontrolle eines Promotors gestellt und in die Pflanze eingebracht werden. Zur Insertion des zu exprimierenden Gens in das Pflanzengenom wird die fremde DNA meistens in das Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* gebracht, und dieses wird dann verwendet, um die Pflanzen zu transformieren. Eine zweite häufig verwendete Methode ist die direkte Transformation von DNA z.B. mit Hilfe der sogenannten "particle gun". In den meisten Fällen werden hierfür bisher aus Bakterien isolierte Promotoren oder Promotoren von Pflanzenviren verwendet, die zur Expression des fremden Gens in den Pflanzen führen. Diese Promotoren haben für bestimmte Anwendungen den Nachteil, daß sie artfremd sind und daher nicht den Kontrollmechanismen innerhalb der Pflanzen unterliegen.

Bei Verwendung eines pflanzlichen Promotors ist die Expression eines fremden Gens möglich, die somit auch den pflanzlichen Kontrollmechanismen unterliegt. Durch Untersuchungen der Expression des Gens, vor dem der Promotor ursprünglich liegt, lassen sich genaue Kenntnisse über die Expressionsstärke, die Zeit, zu der das Gen exprimiert wird, und den Expressionsort sammeln, die auf die Expression eines fremden Gens, das unter die Kontrolle dieses Promotors gestellt wird, weitgehend übertragbar sind. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß bei Verwendung eines genau charakterisierten, pflanzlichen Promotors gezielte Eingriffe und Untersuchungen in die Entwicklung bestimmter Pflanzenteile möglich sind.

Aufgabe und Lösung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Promotor bereitzustellen, der zur Steuerung der Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen bzw. Pflanzenzellen geeignet ist. Dabei ist ein Teilaspekt der Aufgabe solche Promotoren bereitzustellen, die eine hohe Expression bei gleichzeitiger Gewebespezifität aufweisen. In einem weiteren Aspekt liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung männlich steriler Pflanzen bereitzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem Aspekt gelöst durch eine Nukleinsäuresequenz codierend für einen Promotor, wobei der Promotor sowohl tapetumspezifisch als auch pollenspezifisch ist.

In einem zweiten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Nukleinsäuresequenz codierend für einen Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz einen Bereich von mindestens etwa 900 Nukleotiden stromaufwärts der TATA-box der in SEQ ID No.1 dargestellten Sequenz umfaßt.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Nukleinsäuresequenz einen Bereich von mindestens etwa 1000 Nukleotiden stromaufwärts der TATA-box der in SEQ ID No.1 dargestellten Sequenz umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Nukleinsäuresequenz einen Bereich von mindestens etwa 1500 Nukleotiden stromaufwärts der TATA-box der in SEQ ID No.1 dargestellten Sequenz umfaßt.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Sequenz umfaßt.

Die Aufgabe wird in einem weiteren Aspekt auch gelöst durch eine Nukleinsäuresequenz codierend für einen Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID No.2 dargestellten Sequenz umfaßt.

In einem vierten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Nukleinsäuresequenz codierend für einen Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID No.3 dargestellten Sequenz umfaßt.

In einem fünften Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Expressionssystem umfassend mindestens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß das Expressionssystem weiterhin mindestens einen Terminator und/oder einen Linker umfaßt.

In einem sechsten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Nukleinsäurekonstrukt umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz und zumindest einen Teil einer exprimierbaren Nukleinsäuresequenz.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß der Teil der exprimierbaren Nukleinsäuresequenz oder die vollständige exprimierbare Sequenz mit einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in sense-Richtung verbunden ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß die exprimierbare Nukleinsäure für eine Invertase codiert.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß der Teil der Nukleinsäuresequenz einer Invertase oder die vollständige Sequenz einer Invertase mit der einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in anti- sense-Richtung verbunden ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen daß die Invertase eine solche ist, die in einer Struktur vorhanden ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Antheren, Tapetum, Pollenvorläuferzellen und Pollen umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Invertase aus dem Organismus stammt, in den oder in dessen Zellen das Nukleinsäurekonstrukt eingeführt werden soll, und insbesondere aus der Pflanzengruppe stammt, zu der die Spezies gehört, in die das Nukleinsäurekonstrukt eingeführt werden soll.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß der Organismus ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nutzpflanzen, Zierpflanzen und Arzneipflanzen umfaßt.

In einem siebten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch einen Vektor umfassend eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder ein erfindungsgemäßes Expressionssystem 9 und/oder ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt.

In einem achten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Zelle, insbesondere Pflanzenzelle, umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder ein erfindungsgemäßes Expressionssystem und/oder ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Zelle eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, die ein Promotor ist, und eine Nukleinsäure, die für einen Inhibitor einer Invertase codiert, umfaßt, wobei der Promotor die Expression des Inhibitors steuert.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe, die Pollenzellen, Pollenvorläuferzellen und Zellen des Tapetums umfaßt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Zelle eine arretierte Pollenzelle ist.

In einem neunten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Pflanze umfassend eine erfindungsgemäße Zelle.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nutzpflanzen, Zierpflanzen und Arzneipflanzen umfaßt, bevorzugterweise ausgewählt ist aus der Gruppe, die Reis, Mais, Kartoffeln, Tomaten und Raps umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Pflanze eine männlich sterile Pflanze ist und zumindest eine weitere Änderung ihres Genotyps aufweist, insbesondere eine gentechnologisch bedingte Veränderung.

In einem zehnten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Samen, der gewinnbar ist aus einer erfindungsgemäßen Pflanze.

In einem elften Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch einen Hybridsamen, der dadurch erhältlich ist, daß eine erfindungsgemäße männlich sterile Pflanze mit einer anderen männlich fertilen Pflanze gekreuzt wird und aus der solchermaßen entstandenen Filialgeneration der Hybridsamen gewonnen wird.

In einem zwölften Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung männlicher steriler Pflanzen, wobei ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in eine Zelle, insbesondere in eine Pflanzenzelle, eingebracht wird und ausgehend von dieser Zelle eine Pflanze erzeugt wird.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nutzpflanzen, Zierpflanzen und Arzneipflanzen umfaßt, bevorzugterweise ausgewählt ist aus der Gruppe, die Reis, Mais, Kartoffeln, Tomaten und Raps umfaßt.

In einem dreizehnten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes zur Herstellung männlich steriler Pflanzen.

In einem vierzehnten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz zur Expression einer Nukleinsäuresequenz.

In einem fünfzehnten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Restorer-Pflanze, wobei sie in einer Zelle, bevorzugterweise in der Mehrzahl ihrer Zellen, eine erfindungsgemäße Nukleinsäure als Promotor und eine für eine weitere Invertase codierende Nukleinsäure umfaßt, die von diesem Promotor gesteuert wird, wobei die weitere Invertase verschieden ist von der zelleigenen Invertase.

In einem sechzehnten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine restorer-Pflanze, die bevorzugt eine solche sein kann, wie vorstehend beschrieben, wobei vorgesehen ist, sie in einer Zelle, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, eine erfindungsgemäße Nukleinsäure als Promotor und

eine für ein Saccharose-Transportsystem codierende Nukleinsäure umfaßt, die von diesem Promotor gesteuert wird.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß sie in einer Zelle, bevorzugterweise in der Mehrzahl ihrer Zellen, weiterhin eine erfindungsgemäße Nukleinsäure als Promotor und eine für Saccharose-Synthase und/oder cytoplasmatisch exprimierte Invertase codierende Nukleinsäure umfaßt, deren Expression von dem Promotor gesteuert wird.

In einem siebzehnten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Pflanze, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie in mindestens einer Zelle, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt umfaßt und die Zelle(n) weiterhin eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz als Promotor und eine für eine weitere Invertase codierende Nukleinsäure umfaßt, die von diesem Promotor gesteuert wird, wobei die weitere Invertase verschieden ist von der zelleigenen Invertase.

In einem achtzehnten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Pflanze, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie in mindestens einer Zelle, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt umfaßt und die Zelle(n) weiterhin eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz als Promotor und eine für ein Saccharose-Transportsystem codierende Nukleinsäure umfaßt, die von diesem Promotor gesteuert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Pflanze auch die Merkmale der Pflanze gemäß dem siebzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, da die Pflanze in mindestens einer Zelle, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt umfaßt und die Zelle(n) weiterhin eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz als Promotor und eine für Saccharose-Synthase und/oder cytoplasmatisch exprimierte Invertase codierende Nukleinsäure umfaßt, deren Expression von dem Promotor gesteuert wird.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die weitere, von der zelleigenen Invertase verschiedene Invertase ausgewählt ist aus der Gruppe von Invertasen, die Invertase(n) von *Saccharomyces cerevisiae* und Invertase(n) von *Zymomonas mobilis* umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Saccharose-Synthase heterologen oder homologen Ursprungs ist.

In einer noch weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die cytoplasmatisch exprimierte Invertase homologen oder heterologen Ursprungs ist.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß die cytoplasmatisch exprimierte Invertase heterologen Ursprungs ist und bevorzugterweise ausgewählt ist aus der Gruppe von Invertasen, die Invertase(n) von *Saccharomyces cerevisiae* und Invertase(n) von *Zymomonas mobilis* umfaßt.

In einem neunzehnten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch einen Samen, der von einer erfindungsgemäßen Pflanze gewonnen werden kann..

In einem zwanzigsten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Samen für die in vitro Embryogenese von haploiden oder diploiden oder doppelt diploiden Pflanzen.

In einem einundzwanzigsten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Frucht, insbesondere samenlose Frucht, die von einer der erfindungsgemäßen Pflanzen gewonnen werden kann.

In einem zweiundzwanzigsten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch eine Frucht, die von einer der erfindungsgemäßen Pflanzen gewonnen werden kann, insbesondere von einer erfindungsgemäßen restorer-Pflanze und deren erfindungsgemäßen Kreuzungsprodukten.

In einem dreiundzwanzigsten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Klonierung von Promotoren, die funktionell homolog sind zu einem der Promotoren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Verfahren durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- a) Kloniere von Antheren-spezifischer Invertase cDNA durch RT-PCR an mRNA aus Antheren, insbesondere unter Verwendung der Oligonukleotide OIN3 und OIN4
- b) Klonieren der entsprechenden Promotoren

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, daß Promotoren existieren, die zur Expression von Nukleinsäuren in Pflanzenzellen geeignet sind und dabei eine doppelte Gewebespezifität zeigen. Die hierin offenbarten Nukleinsäuren, die für einen Promotor codieren, die im folgenden hierin verkürzt auch als Promotoren bezeichnet werden, weisen eine zumindest doppelte Spezifität auf: Sie führen zur Expression von unter ihrer Kontrolle stehender Nukleinsäure im Tapetum und in den Pollen. Darüber hinaus sind die erfindungsgemäßen Promotoren ausgesprochen stark und zeigen ein über die in 12 Phasen eingeteilte Antherenentwicklung einen charakteristischen Verlauf, der erlaubt, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Promotoren ein zeitlich definiertes, spezifisches Expressionsmuster erreicht werden kann. Infolge dieser sowohl räumlichen Spezifität, d.h. Gewebespezifität, als auch zeitlichen Spezifität bieten derartige Vektoren einen großen Vorteil gegenüber durch einen exogenen Stimulus, wie Temperatur oder Anwesenheit bestimmter Verbindungen, induzierbaren Promotoren. Sind derartige Promotoren im Genom einer Pflanze enthalten, kommt es zur räumlich und zeitlich spezifischen Expression der unter der Kontrolle dieses Promotors stehenden Nukleinsäure(n).

Bei den unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotor stehenden Nukleinsäure kann es sich um jegliche Form von Nukleinsäure handeln. Entsprechend kann es sich dabei um codierende Nukleinsäuren oder um strukturelle oder funktionelle Nukleinsäuren handeln.

Unter codierender Nukleinsäure soll dabei insbesondere eine solche Nukleinsäure verstanden werden, die für ein Peptid oder ein Protein codiert. Dabei kann das Peptid/Protein bspw. ein Strukturprotein oder ein eine enzymatische Aktivität aufweisendes Peptid/Protein sein.

Unter struktureller Nukleinsäure soll hierin insbesondere eine solche Nukleinsäure verstanden werden, die zur Ausbildung von Komplexen insbesondere mit anderen Molekülen führt. Dabei kann es sich u.a. um eine rRNA handeln und insbesondere eine antisense-Nukleinsäure.

Unter funktionaler Nukleinsäure soll hierin insbesondere eine solche Nukleinsäure verstanden werden, die auf ein System, insbesondere ein biologisches System eine bestimmte Wirkung ausübt. Eine derartige bestimmte Wirkung kann beispielsweise in der Förderung oder Hemmung der Translation oder Transkription bestehen. Ein Beispiel für eine funktionale Nukleinsäure ist eine antisense-Nukleinsäure.

Für den Fachmann ist offensichtlich, daß die vorstehenden Definitionen verschiedene Aspekte von Nukleinsäuren betreffen und insoweit keine sich ausschließenden Definitionen darstellen. Vielmehr ist es sehr wohl möglich, daß ein und dieselbe Nukleinsäure unter zwei oder mehrere der Definitionen fällt.

Die erfindungsgemäßen Promotoren erlauben die räumlich und zeitlich bestimmte Expression von Nukleinsäuren, insbesondere von Genen in Pflanzenzellen und Pflanzen. Dabei kann es sich um homologe oder heterologe Nukleinsäuren oder Gene handeln. Im Falle von homologen Genen handelt es sich um solche, die aus dem genetischen Hintergrund der Pflanze, die einen der erfindungsgemäßen Promotoren enthält, stammen. Mit anderen Worten, es werden in der Zelle bereits vorhandene Gene oder Nukleinsäuresequenzen entweder ergänzend oder ersetzend unter die Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotoren gestellt. Im Falle von heterologen Genen oder Nukleinsäuren handelt es sich um solche, die nicht aus dem genetischen Hintergrund der Pflanze, die einen der erfindungsgemäßen Promotoren enthält, stammen bzw. in diesem vorhanden sind.

Der Erfindung liegt weiterhin die überraschende Erkenntnis zugrunde, daß es möglich ist insbesondere unter Verwendung eines der erfindungsgemäßen Promotoren männlich sterile Pflanzen zu erzeugen. Hierzu wird unter die Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren eine Nukleinsäure gestellt, die zumindest für einen Teil einer Invertase codiert. Bei der Invertase handelt es sich bevorzugt um eine solche, die in Pollen vorhanden und/oder im Tapetum vorhanden ist und aus der jeweiligen Pflanzenspezies stammen kann. Als besonders bevorzugt hat sich dabei die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 15 oder ein Teil davon erwiesen. Bei der von SEQ ID No 15 codierten Invertase handelt es sich um eine solche, die aus den Pollen von Tabak isoliert wurde. Ein Teil der diese Invertase codierenden Nukleinsäure wird unter die Kontrolle eines erfindungsgemäßen Promotors gebracht, so daß das Expressionsprodukt der die Invertase codierenden Nukleinsäure als antisense-

Nukleinsäure wirkt und in der Folge die Expression der in den Pollen und dem Tapetum vorhandenen Invertase unterdrückt. Die Produktion der antisense-Nukleinsäure erfolgt dabei dadurch, daß die für die Invertase codierende Nukleinsäure oder ein Teil davon in anti-sense Richtung an den Promotor, ggf. abgetrennt durch eine zusätzliche Nukleinsäuresequenz bspw. in Form eines Linkers, funktional gekoppelt wird. Dies wird dadurch bewerkstelligt, daß die nicht-codierende oder anti-sense Strang durch den Promotor abgelesen wird, mithin die die Invertase codierende Nukleinsäure invertiert eingebaut wird.

Wie hierin im folgenden gezeigt werden wird, kommt es unter dem Einfluß eines derartigen Konstruktes zur Ausbildung von sterilen Pollen bzw. von sterilen männlichen Pflanzen. Ohne darauf festgelegt sein zu wollen, scheint es so, daß infolge der antisense-Nukleinsäure die Expression der Invertase im Tapetum und in den Pollen dadurch unterdrückt wird, daß die antisense-Nukleinsäure mit der sense-Nukleinsäure, die von dem Gen der in den besagten Geweben vorhandenen Invertase abgelesen wird, in Wechselwirkung tritt und somit eine Translation nicht mehr erfolgt. In der Folge sinkt der Titer an Invertase in den Geweben mit der Folge, daß zum einen ein energetischer Mangelzustand insbesondere in den Pollen auftritt und sich darüber hinaus das Verhältnis von Disaccharid, insbesondere von Saccharose, zu einem oder beiden der Monomeren davon ändert. Dies führt zu der beobachteten Infertilität der Pollen und damit der männlichen Infertilität von Pflanzen, die derartige Pollen tragen.

Bei dem vorstehend geschilderten Mechanismus ist dabei beachtlich, daß infolge des gewebespezifischen und zeitlichen Expressionsmusters der erfindungsgemäßen Vektoren die antisense-Nukleinsäure genau dann auftritt, wenn auch die in den besagten Geweben auftretende Invertase besonders aktiv ist und supprimiert werden muß, um den oben beschriebenen energetischen Mangelzustand und/oder Verschiebung des Disaccharid- zu Monosaccharid-Verhältnisses zu bewirken. Infolge der Stärke der erfindungsgemäßen Promotoren wird die antisense-Nukleinsäure in so großem Maße exprimiert, daß eine wirksame Unterdrückung der intrinsischen Invertase-Aktivität in den Pollen und dem Tapetum erfolgt. Infolge dieses hierin offenbarten Mechanismus der Ausbildung von sterilen Pollen und männlich sterilen Pflanzen bleiben die Pollen in einem definierten Stadium ihrer Entwicklung arretiert. Dieses spezielle Stadium wird als einkerniges Mikrosporenstadium bezeichnet, das im Rahmen der normalen Entwicklung – fertiler – Pollen ansonsten durchlaufen wird.

Dieser Mechanismus zur Ausbildung männlicher Sterilität bei Pflanzen tritt nicht nur bei Tabak oder Tomaten auf. Vielmehr kann der Promotor in einer jeglichen Pflanze bzw. Pflanzenart verwendet werden. Gleiches gilt im Prinzip auch für die in antisense-Orientierung funktional mit einem der erfindungsgemäßen Promotoren verbundenen, für eine Invertase oder einen Teil davon, codierenden Nukleinsäure. Da es jedoch mechanismusbedingt zu einer Wechselwirkung zwischen der intrinsisch in den Pollen enthaltenen Invertase (bzw. der von ihnen produzierten extrazellulären Invertase) bzw. der sie codierenden Nukleinsäure, insbesondere mRNA, kommt, ist es vorteilhaft, bei den entsprechenden erfindungsgemäßen Konstrukten die in dem Konstrukt verwendete Invertase-Sequenz so auszuwählen, daß sie identisch ist mit der Sequenz der intrinsischen Invertase oder aber mit dieser einen Homologiegrad aufweist, der eine Wechselwirkung der sense- und anti-sense-Nukleinsäure erlaubt.

Ein weiterer Mechanismus zur Erzeugung männlich steriler Pflanzen stellt die sogenannte Co-Suppression dar. Unter Co-Suppression versteht man den Effekt, daß im Falle der Überexpression eines Gens, das bereits in einer Pflanze vorhanden ist, dies nicht zu einer vermehrten Bildung des von dem Gen codierten Peptids/Proteins führt, sondern vielmehr zu einer reduzierten Bildung. Die Wirkung entspricht somit der des hierin beschriebenen Antisense-Konstruktes umfassend einen der erfindungsgemäßen Promotoren und eine in antisense-Orientierung funktionell daran gekoppelte, für eine Invertase codierende Nukleinsäure. Die Co-Suppression entfaltet ihre Wirkung auf der Transkriptionsebene. Dies hat zur Folge, daß die für die antisense-Konstruktion angestellten Überlegungen betreffend Homologien der unter einen der erfindungsgemäßen Promotoren stehenden Nukleinsäure auch hier zutreffen. Dieser Mechanismus stellt somit auch eine Anwendungsmöglichkeit dar für die hierin offenbarten Nukleinsäurekonstrukte, bei denen eine Nukleinsäure in sense-Orientierung an einen der erfindungsgemäßen Promotoren gebunden ist

Die Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Mechanismen zur Ausbildung von männlicher Sterilität bzw. zur Herstellung von männlich sterilen Pflanzen ist nicht auf bestimmte Pflanzengattungen, Pflanzenarten oder Pflanzensorten beschränkt, vielmehr handelt es sich um einen universell einsetzbaren Mechanismus. Entsprechend werden hierin unter Pflanzen ganz allgemein auch und besonders Nutzpflanzen, Zierpflanzen und Arzneipflanzen verstanden.

Unter Pflanzen im Sinne der vorliegenden Erfindung werden sowohl Monocotyledonen als auch Dicotyledonen verstanden. Monocotyledonen und Dicotyledonen stellen Pflanzengruppen im Sinne der vorliegenden Erfindung dar. Die Verwendung von Invertasen kann sich auf sowohl Invertasen von bzw. bei Monocotyledonen als auch von bzw. bei Dicotyledonen erstrecken. Trotz der Homologie von Invertasen von Mono- und Dicotyledonen, gibt es distinkte Unterschiede, die im Einzelfall für die Konstruktion oder Anwendung beachtlich werden können. Eine weitere bevorzugte Gruppe von Pflanzen, bei denen die verschiedenen Aspekte der Erfindung zur Anwendung oder Verwendung gelangen können, sind auch die folgenden Pflanzen: Reis, Mais, Tomaten, Kartoffeln, Raps, Soja und Zuckerrüben.

Bevorzugte Ausführungsformen

Die beanspruchten, für einen Promotor oder Promotorstruktur codierenden Nukleinsäuresequenzen umfassen die Sequenz nach SEQ. ID. No.1, SEQ. ID. No. 2, SEQ. ID. No. 3 oder jeweils einen Teil davon.

Wie hierin beschrieben, wurde die Sequenz von SEQ. ID. No. 1 aus Tabak in einem funktional orientierten Versuchsansatz erhalten und es konnte gezeigt werden, daß die Sequenz als solches eine Promotoraktivität besitzt. Es ist den Fachleuten auf dem Gebiet auch bekannt, daß bei derartigen Versuchsansätzen oftmals eine längere Sequenz erhalten wird, die Ergänzungen am 5'- oder 3'- Ende aufweisen kann, die für die Promotoreigenschaft unerheblich sind. Im vorliegenden Fall wurde die Sequenz nach SEQ. ID. No. 1 weiter charakterisiert und es wurde festgestellt, daß eine Verkürzung der besagten Sequenz unter Beibehaltung der Promotoreigenschaft möglich ist. Eine Verkürzung der Sequenz von SEQ. ID. No. 1 Auf einen Sequenzabschnitt oder Bereich, der sich ca. 900 Nukleotide oder Basenpaare /bp stromaufwärts, d.h. in 5'-Richtung, von der sogenannten TATA-box erstreckt, hat sich im vorliegenden Fall noch als für das Vorhandensein der Promotoraktivität ausreichend erwiesen. Weitere Ausführungsformen des Promotors erstrecken sich über einen Bereich von etwa 1000 Nukleotiden oder etwa 1500 Nukleotiden stromaufwärts der TATA-box.

Bei dem Promotor nach SEQ. ID. No. 2 handelt es sich um einen Promotor von SEQ ID. No. 1 stammenden Promotor, der gegenüber demjenigen nach SEQ. ID. No. 1 um ca. 1 kb verlängert ist

Die Sequenz nach SEQ. ID. No. 3 entstammt ursprünglich aus der Tomate. Ähnlich wie im Falle des auf der Sequenz nach SEQ.ID. No.1 beruhenden Promotors kann auch dieser Promotor grundsätzlich im Rahmen der Fähigkeiten des Fachmannes weiter verkürzt oder mit zusätzlichen Elementen, wie z.B. enhancern, ergänzt werden unter Beibehaltung der Promotoreigenschaft.

Im Lichte der der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden Erkenntnis ist es nun möglich, entsprechend spezifische Promotoren aus anderen Spezies zu isolieren, d.h. solche Promotoren, die dem orts- und zeitspezifischen Expressionsmuster der erfindungsgemäßen Promotoren entsprechen und somit zu diesen funktionell homolog sind. Dabei wird in einem ersten Schritt Antheren-spezifische Invertase-cDNA durch RT (Reverse Transkriptase)-PCR an mRNA aus Antheren kloniert. In dem daran anschließenden Schritt werden die diese steuernden Promotoren kloniert in eine Weise, wie sie in den Beispielen hierin beschrieben ist. Infolgedessen sind die verschiedenen Anwendungen der hierin beschriebenen Promotoren nicht auf die hierin offenbarten und durch ihre Sequenz charakterisierten Promotoren beschränkt, sondern erstrecken sich auf all jene Promotoren, die die hierin beschriebene doppelte Gewebespezifität besitzen.

Ein jeglicher der erfindungsgemäßen Promotoren kann in ein Expressionssystem eingebracht und Teil eines Expressionssystems sein. Bevorzugt handelt es sich bei den Expressionssystemen um für die Expression in Pflanzen geeignete Expressionssysteme. Expressionssysteme, deren Bestandteile (wie linker, Terminatoren, Insertionssequenzen, Marker etc.) und Aufbau sind in der Literatur beschrieben, wie bspw. Asubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; et al. (eds.) (1999) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Massachusetts; Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.; (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Clark, M.S. (1997) Plant molecular biology – a laboratory manual. Springer, Berlin; Jones, H.; (ed.) Plant gene transfer and expression protocols. Methods in molecular biology, Vol. 49. Humana Press Totowa; Weissbach, A. und Weissbach, H. (eds.) (1988) Methods for plant molecular biology.

Academic Press, San Diego, deren Offenbarungen hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden.

Derartige Expressionssysteme können auch Expressionskassetten sein, wobei insbesondere Restriktionsschnittstellen in geeignetem Abstand zum Promotor und anderen Kassettenbestandteilen bspw. durch sogenannte linker vorhanden sind, die ein Einklonieren der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz erlauben. Handelt es sich bei der zu exprimierenden Nukleinsäure um eine solche, die für ein Peptid, Polypeptid oder Protein codiert, ist dabei besonders zu beachten, daß die Einklonierung im Leserahmen erfolgt.

Die erfindungsgemäßen Expressionssysteme bzw. die sie enthaltenden Vektoren können mit Hilfe von in der Technik bekannten Techniken (Literaturstelle siehe oben) in Pflanzen bzw. Pflanzenzellen transformiert werden (z.B. Agrobakterium vermittelte Transformation; direkte Transformation etc.)

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte umfassen mindestens einen der erfindungsgemäßen Promotoren und zumindest einen Teil einer exprimierbaren Nukleinsäuresequenz. Je nach der Art der exprimierbaren Nukleinsäuresequenz und deren Positionierung relativ zum Promotor ergeben sich verschiedene Anwendungsfelder dieser Nukleinsäurekonstrukte.

Infolge der hohen Expressionsstärke des Promotors eignet sich dieser ganz allgemein dazu, ein hohes Maß an Expressionsprodukt zu erzeugen. Ein Expressionsprodukt kann dabei eine mRNA sein, die ihrerseits in ein Peptid oder Protein translatiert wird. Das Translationsprodukt seinerseits kann entweder eine direkte Wirkung (in einem biologischen System zeigen) oder eine indirekte Wirkung aufweisen. Eine direkte Wirkung wäre beispielsweise die Produktion eines Cytotoxins auf der Grundlage eines Peptids oder die Herstellung eines Strukturproteins. Eine indirekte Wirkung wäre beispielsweise die Herstellung eines Enzyms, das bestimmte metabolische Reaktionen katalysiert, die sich ihrerseits auf den Phänotyp der Zelle bzw. der diese enthaltenden Pflanze auswirkt. Eine weitere Form eines Expressionsproduktes kann aber auch eine funktionale Nukleinsäure sein. Ein Beispiel hierfür stellt das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt, insbesondere jenes nach SEQ ID No. 8 dar, das zur Erzeugung steriler

Pollen führt und damit, wenn ein derartiges Konstrukt in einer Pflanze, genauer in ihrem Genom vorhanden ist, zu männlichen sterilen Pflanzen führt.

Ist eine besonders starke Expression der unter der Kontrolle oder Steuerung eines der erfindungsgemäßen Promotoren stehenden zu exprimierenden Nukleinsäure(sequenz) erforderlich, wird diese typischerweise in der sense-Richtung oder –Orientierung funktionell mit dem Promotor verbunden. Dabei ist der sense-Strang oder codierende Strang derjenige, der transkribiert wird (im Unterschied zur antisense-Richtung oder –Orientierung). Ein Beispiel für ein derartiges, stark exprimierendes Nukleinsäurekonstrukt ist ein solches, wie es hierin für die Co-Suppression und deren Verwendung für die Erzeugung männlich steriler Pflanzen beschrieben ist. Ein weiteres Beispiel für ein derartiges, stark exprimierendes Nukleinsäurekonstrukt besteht aus einem der erfindungsgemäßen Promotoren und der Nukleinsäure, oder einem Teil davon, die für einen Inhibitor einer Invertase, insbesondere der in Pollen und/oder Tapetum auftretenden Invertase, codiert. Die Verwendung eines derartigen Konstruktes stellt ebenfalls eine Möglichkeit der Erzeugung männlicher Sterilität bei Pflanzen dar. Darüberhinaus kann durch diese Maßnahme das erfindungsgemäße Konstrukt, bei dem ein erfindungsgemäßer Promotor mit einer Sequenz verbunden ist, die für eine Invertase oder einen Teil davon codiert, und die Sequenz in anti-sense-Richtung funktional mit dem Promotor verbunden ist, welches bereits sterile Pollen und damit sterile Pflanzen bedingt, hinsichtlich seiner Wirkung im Sinne der Verleihung von männlicher Sterilität, weiter verstärkt werden.

Ein Inhibitor für eine Invertase ist beispielsweise beschrieben von Rausch (Greiner. S.; Krausgrill, S.; Rausch, T.; (1998), Plant Physiol. 116, S. 733 – 742 und Krausgrill, S.; et al. (1998), Plant. J. 13, S. 275 - 280). Bei dem von Rausch et al. beschriebenen und klonierten Inhibitor handelt es sich um ein vergleichsweise kleines Protein von 17 kDa, das mit der Invertase in unmittelbare Wechselwirkung tritt und einen Komplex und deren enzymatische Aktivität blockiert. Allgemein gibt es Invertase-Inhibitoren gegen extrazelluläre und vacuoläre Invertasen, die grundsätzlich alle verwendet werden können. Bevorzugterweise wird ein apoplastischer Inhibitor verwendet, wie er auch von Rausch et al. beschrieben ist (aaO). Alternativ kann auch ein intrazellulärer Invertase-Inhibitor verwendet werden, der mit einem Apoplasten-(extrazellulärer Raum)-Targeting-Signal verbunden ist.

Ganz allgemein kann aufgrund der durch die erfindungsgemäßen Promotoren bedingten starken Expression der unter ihrer Kontrolle oder Steuerung stehenden Nukleinsäuren, die sowohl gewebespezifische (Pollen- und Tapetum- und damit Antheren-spezifisch) als auch zeitlich spezifisch (nur während der Pollenbildung) ist, große Mengen eines bestimmten Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Ort (Antheren) von transgenen Pflanzen mittels dieser produzieren. Das spezielle Protein kann dann durch Ernten der Antheren, Aufschluß und für das spezielle Protein spezifische Reinigungsverfahren in großen Mengen gewonnen werden.

Weiterhin erlauben die erfindungsgemäßen Promotoren und deren Verwendung in transgenen Pflanzen, in die Entwicklung der Antheren von Pflanzen einzugreifen. Ein Beispiel ist die oben bereits erläuterte antisense-Expression von Invertase-Sequenzen, in deren Folge die Menge an extrazellulärer Invertase im Tapetum und den Pollen verringert wird und zu männlichen sterilen Pflanzen führt, die in der Landwirtschaft, bei der Herstellung von Hybridsaatgut von Bedeutung sind.

Hybridsaatgut ist für die moderne Landwirtschaft von zentraler Bedeutung, da es besonders leistungsfähige bzw. ertragreiche Pflanzen liefert. Hybridsamen entstehen aus zwei genetisch unterschiedlichen Elternteilen, wobei die Verschiedenheit des genetischen Hintergrundes der Elternpflanzen für die besonderen Eigenschaften bzw. die Verstärkung der positiven Eigenschaften in der Filialgeneration gegenüber den Elternpflanzen verantwortlich ist. Dies wird als Heterosisseffekt bezeichnet.

Beim Anbau von Pflanzen zum Zwecke der Erzeugung derartiger Hybridpflanzen muß deshalb vermieden werden, daß es zu einer Vermehrung von Pflanzen mit gleichem genetischen Hintergrund kommt. Die Vermeidung kann bei getrenntgeschlechtlichen Pflanzen durch räumliche Separation erfolgen, wobei diese jedoch nicht in einem jeden Fall die erforderliche Zuverlässigkeit gewährleistet. Alternativ werden die Antheren der männlichen Pflanzen manuell entfernt, was sehr zeitaufwendig und insbesondere bei kleinblütigen Pflanzen und Zwittern besonders schwierig ist. Hier ist die Erzeugung von männlich sterilen Pflanzen die Methode der Wahl und damit die Verwendung der erfindungsgemäßen Promotoren und diese enthaltenden Konstrukte.

Die Verwendung männlich steriler Pflanzen ist noch mit weiteren Vorteilen verbunden. So wird infolge der begrenzten Natur des Eingriffs, der zur männlichen Sterilität bedingt durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Promotoren und der sie enthaltenden Konstrukte führt, das vegetative Wachstum der Pflanze nicht gestört.

Die vorstehend für die Herstellung von Hybridsamen beschriebenen Vorteile der erfindungsgemäßen Promotoren, der diese enthaltenden Konstrukte und Pflanzen gelten sinngemäß auch für transgene Pflanzen, denen man unter Verwendung gentechnologischer Methoden (zusätzlich zur Einführung eines der erfindungsgemäßen Promotoren) bestimmte Eigenschaften verliehen hat. Darüber hinaus besteht bei Verwendung männlich steriler Pflanzen nicht die Gefahr des Auskreuzens der genetischen Veränderung(en) auf Pflanzen (infolge der Vermeidung von Pollenflug), die auf benachbarten Feldern oder wild wachsen. Weiterhin sind infolge der speziellen Art des Eingriffs, d.h. der erfindungsgemäßen Ausbildung von männlicher Sterilität, keine Wechselwirkungen mit den zusätzlich eingebrachten genetischen Veränderungen zu erwarten. Insoweit sind die erfindungsgemäßen Promotoren und die sie enthaltenden Konstrukte besonders vorteilhafte biologische Sicherheitssysteme bzw. sind transgene Pflanzen, die diesen Mechanismus der männlichen Sterilität in sich tragen, als besonders sicher im Sinne des Ausschlusses einer unerwünschten Verbreitung gentechnologisch veränderter Pflanzen zu betrachten.

Die erfindungsgemäßen Promotoren und die sie enthaltenden Konstrukte können auch dazu verwendet werden, transgene Pflanzen herzustellen, die pflanzeneigene Stoffe in großen Mengen herstellen, die positiv auf die Entwicklung der Pflanzen, insbesondere den Ertrag von fruchttragenden Pflanzen, wirken können. Beispiele für solche pflanzeneigene Stoffe wären Wachstumshormone oder Protein, die zur Energieversorgung der wachsenden Gewebe (z.B. Invertasen, Zuckertransporter) notwendig sind. Eine derartige Steigerung kann unmittelbar durch ein eingeführtes Gen oder unmittelbar als das Resultat eines Eingriffes in einen Regelkreis bedingt werden. Als Wachstumshormone, die eine überwiegend stimulierende Wirkung haben, können dabei Auxine, Cytokinine, Giberelline, Brassinosteroide und Jasmonat angeführt werden. Als überwiegend hemmende Wachstumshormone können Abszissinsäure und Ethylen angeführt werden.

Daß die erfindungsgemäßen Promotoren nicht nur für eine Hochregulation (up-Regulation) der Produktion von von der Pflanze produzierten Verbindungen verwendet werden können, sondern auch zur Reduktion von von der Pflanze produzierten, d.h. pflanzeneigenen Stoffen (bspw. Pflanzenhormonen), ergibt sich für den Fachmann aufgrund seines Wissens bei Berücksichtigung des jeweils zu ändernden Systems. Diese Reduktion kann durch Einbringen von abbauenden Enzymen, Inhibitoren oder durch sog. „single-chain“ Antikörper erreicht werden. Auch mittels derartiger Systeme kann bereits die männliche Sterilität verringert werden, so daß eine Kombination auch dieses Systems mit den hierin offenbarten Systemen der Erzeugung männlicher Sterilität möglich ist und somit das Maß der männlichen Sterilität gesteigert werden kann.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung männlich steriler Pflanzen wird das hierin offenbarte Nukleinsäurekonstrukt nach SEQ ID. No. 8 umfassend einen der erfindungsgemäßen Promotoren und funktional damit verbunden eine für eine Invertase codierende Nukleinsäuresequenz in eine Pflanzenzelle eingebracht. Bei der Pflanzenzelle kann es sich um eine jegliche Zelle einer Pflanze handeln, insbesondere um eine Blattzelle infolge deren totipotenten Charakter, d.h. ihrer Fähigkeit sich zu jedem Pflanzenzelltyp zu differenzieren. Die mit dem Konstrukt versehene (Pflanzen-) Zelle wird sodann zu einer vollständigen Pflanze entwickelt oder regeneriert. Diese Pflanze kann dann ihrerseits vegetativ vermehrt werden, bspw. durch Stecklingsvermehrung. Eine sehr ähnliche Vorgehensweise wird angewandt, wenn männlich sterile Pflanzen unter Verwendung des für die Co-Suppression verwendeten Systems bzw. Nukleinsäurekonstruktes erzeugt werden.

Eine besondere Form der erfindungsgemäßen Pflanzen sind die sogenannten restorer-Pflanzen. Diese restorer-Pflanzen sind erforderlich, um die Erträge von sterilen, fruchtetragenden Pflanzen, wie bspw. Mais und Raps, zu erhalten und für die Vermehrung der erfindungsgemäßen männlich sterilen Pflanzen.

Die restorer-Pflanzen zeichnen sich dadurch aus, daß sie ein Konstrukt enthalten, das zur Herstellung einer Invertase führt. Diese Invertase gewährleistet die Kohlenhydratversorgung der Antheren und damit des Tapetums und der Pollen. Die Invertase ist bevorzugterweise eine heterologe Invertase der restorer-Pflanze, d.h. sie ist verschieden von der/den Invertase(n), die in den Antheren, genauer dem Tapetum und/oder den Pollen enthalten ist/sind. Diese

Invertase kann auch verschieden sein von derjenigen/denjenigen Invertasen der Pflanze, mit der die restorer-Pflanze gekreuzt werden soll. Diesbezüglich geeignete Invertasen sind bspw. artfremde Invertasen (z.B. Invertasen von *Saccaromyces cerevisiae* oder von Bakterien wie *Zymomonas mobilis*). Statt Invertasen können auch Saccharose-Transportsysteme (für den Transport der Saccharose über die Zellmembran) in Verbindung mit intrazellulären saccharosespaltenden Enzymen (z.B. Saccharose-Synthase oder neutrale oder vakuoläre Invertasen) zu diesem Zweck verwendet werden. Dabei ist entscheidend, daß bei den erfindungsgemäßen restorer-Pflanzen die vorstehende, die Zuckerversorgung der Antheren wiederherstellende enzymatische Aktivität unter der Kontrolle eines erfindungsgemäßen Promotors steht.

Werden nun derartige erfindungsgemäße restorer-Pflanzen mit den erfindungsgemäßen männlich sterilen Pflanzen gekreuzt, sind beide jeweils einen der erfindungsgemäßen Promotoren umfassende Konstrukte in einer Zelle bzw. einer Pflanze enthalten. Infolge des die männliche Sterilität bedingenden erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes wird eine antisense-Nukleinsäure gebildet, die die Expression der zelleigenen Invertase unterbindet und damit die Zuckerversorgung der Antheren unterbricht mit der Folge, daß die Pollen steril sind und sich im übrigen auch die Anzahl der gebildeten Pollen drastisch verringert. Gleichzeitig wird jedoch das durch die restorer-Pflanze in die Pflanze (Filialgeneration 1) eingebrachte Konstrukt, das einen der erfindungsgemäßen Promotoren und eine Nukleinsäure für eine bevorzugt heterologe Invertase oder ein oben beschriebenes Substitut-System dazu umfaßt, eine Zuckerversorgung aufrechterhalten. Dadurch daß bei beiden Konstrukten der gleiche oder zumindest hinsichtlich des Expressionsverhaltens ein ähnlicher Promotor verwendet wird, tritt eine Kompensation der Unterbrechung der Zuckerversorgung (bedingt durch den die männliche Sterilität verursachenden Mechanismus) durch das die Zuckerversorgung gewährleistende System der restorer-Pflanze auf. Dies wird möglich, da infolge der Verschiedenheit des Invertase Systems der restorer-Pflanze dieses nicht vom antisense-Mechanismus der männlich sterilen Pflanze beeinflusst und damit beeinträchtigt wird.

Die restorer-Pflanzen der vorliegenden Erfindung können in die folgenden drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfaßt Pflanzen, die in ihren Zellen, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, einen der erfindungsgemäßen Promotoren und eine für eine weitere Invertase codierende Nukleinsäure enthält, die von diesem Promotor gesteuert wird, wobei die

weitere Invertase verschieden ist von der zelleigenen oder anthereneigenen oder pflanzeneigenen Invertase. Die zweite Gruppe umfaßt Pflanzen, die in ihren Zellen, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, einen der erfindungsgemäßen Promotoren und eine für ein Saccharose-Transportsystem codierende Nukleinsäure enthält, wobei diese Nukleinsäure von diesem Promotor gesteuert oder kontrolliert wird. Eine Untergruppe dieser zweiten Gruppe von Pflanze umfaßt dabei noch einen weiteren der erfindungsgemäßen Promotoren, der eine zusätzlich vorhandene Nukleinsäure steuert, die für eine Saccharose-Synthase und/oder cytoplasmatisch exprimierte Invertase codiert. Die dritte Gruppe von Pflanzen sind restorer-Pflanzen, die die Konstrukte der beiden ersten Gruppen in sich vereinen.

Werden die männlich sterilen Pflanzen der vorliegenden Erfindung mit den erfindungsgemäßen restorer-Pflanzen gekreuzt, vereinigen sich die verschiedenen Genotypen der Elternzellen und damit koexistieren die verschiedenen, jeweils bevorzugt unter der Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren stehenden für Invertaseaktivität oder entsprechende Substitute codierenden Nukleinsäuren. Die solchermaßen erhaltenen erfindungsgemäßen Pflanzen (Filialgeneration 1) sind männlich fertil und liefern den Hybridsamen, der für das weitere Auftreten des Heterosiseffektes und die Ausbildung von Pflanzen erforderlich ist, bei denen das eigentliche Ernteprodukt der Samen ist, wie beispielsweise bei Mais oder Raps.

Neben der Verwendung derartiger restorer-Systeme besteht eine Möglichkeit, die erfindungsgemäße männlich sterile Pflanze wieder fertil zu machen und damit in einen Zustand zu überführen, der eine sexuelle Vermehrung erlaubt, darin, daß die erfindungsgemäßen Pollen, die im einkernigen Mikrosporen-Stadium arretiert sind, in einer in vitro Kultivierung zu fertilen Pollen entwickelt werden, die dann zur Befruchtung von Pflanzen, bevorzugt transgenen Pflanzen, verwendet werden, wobei die hierin beschriebenen Pflanzen, die einen der erfindungsgemäßen Promotoren in sich tragen, ebenfalls als transgene Pflanzen bezeichnet werden

Die erfindungsgemäßen sterilen Pollen der männlich sterilen Pflanzen liegen arretiert im einkernigen Mikrosporenstadium vor. Diese Pollen können nun verwendet werden, um daraus im Rahmen einer in vitro Embryogenese haploide Pflanzen heranzuziehen, die dann ihrerseits u.a. zu homozygoten diploiden Pflanzen gezüchtet werden können. Damit steht ein System

und Verfahren zur Verfügung, das die zu pflanzenzüchterischen Zwecken vorteilhaften homozygoten diploiden Pflanzen bereitstellt. Dieses System wird im wesentlichen dadurch ermöglicht, daß bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung männlich steriler Pflanzen bzw. von den männlich sterilen Pflanzen noch Pollen hergestellt werden im Gegensatz zu anderen Verfahren zur Herstellung männlich steriler Pflanzen, bei denen keine Pollen gebildet werden, wie dies bspw. bei dem zytotoxischen Verfahren zur Herstellung männlich steriler Pflanzen (beschrieben in Mariani, C. et al. (1990) Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. Nature 347, 737-741]) der Fall ist.

Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen männlich sterilen Pflanzen stellt die Produktion samenloser Früchte dar.

Ein Verfahren zur Herstellung haploider oder dihaploider, homozygoter Pflanzen als wichtiges Ausgangsmaterial für die Pflanzenzüchtung umfaßt somit die Schritte, den sterilen Pollen einer erfindungsgemäßen Pflanze zu gewinnen und diesen dann anschließend durch in vitro Embryogenese zu haploiden oder dihaploiden Pflanzen zu regenerieren. Die in vitro Embryogenese ist als solches den Fachleuten auf dem Gebiet der Technik bekannt und bspw. beschrieben in Reynolds, T.L. (1997) Pollenembryogenesis. Plant Mol. Biology 33, 1-10. Grundsätzlich ist zur Induktion der in vitro Embryogenese ein Hunger- und Stress-Schritt erforderlich. Bei den erfindungsgemäßen männlich sterilen Pflanzen ist die Zuckerversorgung gestört. Ohne darauf festgelegt sein zu wollen, scheint es so zu sein, daß die Pollen der erfindungsgemäßen Pflanzen eine höhere Kompetenz zum Durchlaufen der in vitro Embryogenese aufweisen, zumindest benötigen diese Pollen keine (zusätzliche) Hunger- oder Stress-Behandlung mehr. In der Folge läuft die Embryogenese ausgehend von diesen Pollen schneller und effizienter ab.

Figuren und Beispiele

Im folgenden wird die Erfindung an Hand der Figuren und Beispielen erläutert, aus denen sich weitere Merkmale, Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung allgemein ergeben. Dabei zeigt

- Fig. 1 in Teil (A) photographisch die verschiedenen Stadien der Blütenentwicklung von Tabak, in Teil (B) das Gewicht und die Länge der Antheren von Tabak als Funktion der Blütenentwicklungsstadien und in Teil (C) die Invertase-Aktivität in Pollen vom Wildtyp bzw. in sterilen Pollen;
- Fig. 2 ein Autoradiogramm eines Northern Blots, mit dem die Lokalisation der extrazellulären Invertase NIN 88 von Tabak bestimmt wird;
- Fig. 3 das besondere räumliche und zeitliche Muster des Auftretens des NIN 88-Proteins zunächst im Tapetum, dann in den sich entwickelnden Pollen;
- Fig. 4 eine schematische Darstellung verschiedener Konstrukte, die einen der erfindungsgemäßen Promotoren umfassen;
- Fig. 5 die um ca. 1 kb am 5'-Ende ergänzte und mit Annotierungen versehene Sequenz nach SEQ ID No.1, die hierin als SEQ ID No. 2 bezeichnet wird;
- Fig. 6 in Teil (A) eine photographische Darstellung einer Anthere einer wt Pflanze (oben) und von Antheren transgener Tabakpflanzen (unten), bei denen eine beta-Glucuronidase-Aktivität unter der Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren steht, in Teil (B) Pollen von Antheren transgener Tabakpflanzen bei denen eine beta-Glucuronidase-Aktivität unter der Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren steht, in Teil C, vergleichend zu B, Pollen von Antheren von Pflanzen vom Wildtyp (wt).
- Fig. 7 rasterelektronenmikroskopische und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Tabakpollen von Wildtyppflanzen und von einer erfindungsgemäßen männlich sterilen Pflanze;
- Fig. 8 eine Darstellung der Pollination verschiedener Formen der erfindungsgemäßen männlich sterilen Pflanzen;
- Fig. 9 eine Darstellung der Stärkeakkumulation verschiedener Formen der erfindungsgemäßen männlich sterilen Pflanzen;
- Fig. 10 photographische Aufnahmen von Pollen von Tabakpflanzen vom Wildtyp und von männlich sterilen Pflanzen gemäß der vorliegenden Erfindung;
- Fig. 11 photographische Aufnahmen des Keimverhaltens von Pollen von Tabakpflanzen vom Wildtyp und von männlich sterilen Pflanzen gemäß der vorliegenden Erfindung;

Fig. 12 photographische Aufnahmen von Antheren von transgenen Tomaten, die einen aus Tabak stammenden erfindungsgemäßen Promotoren enthalten, der die Expression von beta-Glucuronidase steuert;

Fig. 13 einen Northern Blot zum Nachweis der Antheren-spezifischen Expression der extrazellulären Invertase LIN 7 in Tomaten;

Fig. 14 die spezifische Expression von LIN 7 im Tapetum und in den Pollen von Tomaten;

Fig. 15 die genomische Sequenz von NIN 88;

Fig. 16 das erfindungsgemäße Konstrukt aus dem Promotor nach SEQ ID No. 1 und dem unter dessen Kontrolle stehenden, in antisense-Orientierung stehenden Teils der Invertase NIN 88, wie auch dargestellt in SEQ ID. No. 8; und

Fig. 17 die Sequenz von LIN 7 mit Annotationen.

Beispiel 1: Blütenentwicklung bei Tabakpflanzen

Die Blütenentwicklung bei Tabakpflanzen wird im allgemeinen (Koltunow, A.M. (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. Plant Cell 2, 1201-1224 in insgesamt zwölf verschiedene Stadien eingeteilt, die in Teil (A) von Fig. 1 dargestellt sind. In den verschiedenen Stadien erhöht sich die Länge der Antheren bis zum Stadium 4 rapide, um dann in den Stadien 4 bis 10 in etwa konstant zu bleiben und nach einem erneuten Anstieg in Stadium 11 in Stadium 12 auf den Ausgangswert zurückzufallen. Hinsichtlich des Gewichts der Antheren erfolgt ebenfalls ein Anstieg bis zum Stadium 4, der sich weniger schnell bis zum Stadium 9 fortsetzt, um sich dann in Stadium 9 bis 11 erneut deutlich zu verringern und schließlich im Stadium 12 auf einen Wert von etwa oder unter den in Stadium 1 abzusinken (Teil (B) von Fig. 1). Auch die enzymatische Invertase-Aktivität in Tabakpollen, ausgedrückt als $\mu\text{g Glucose/MioPollen}\cdot\text{h}$, steigt bis zum Stadium 9 an, um dann wieder abzufallen (Fig. 1, Teil (C)). Zusätzlich ist in Teil (C) von Fig. 1 die Invertase-Aktivität von sterilen Pollen, die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wurden, dargestellt. Die Invertaseaktivität ist dabei unabhängig vom Entwicklungsstadium nahezu konstant und belegt damit die erfolgreiche Hemmung der von den Pollen produzierten Invertase vermittels des in Beispiel 4 erläuterten Konstruktes, das in Fig. 16 und in SEQ ID No. 8 dargestellt ist.

Beispiel 2: Klonierung des Gens der extrazellulären Invertase NIN 88 aus Tabak

Es wurde ein 750 bp cDNA-Fragment der extrazellulären Invertase NIN 77 unter Verwendung von reverser Transkriptase von mRNA aus Tabak-Antheren und PCR unter Verwendung der Oligonukleotide OIN 3 und OIN 4 kloniert. OIN 3 und OIN 4 sind Primer, die für das Klonieren von pflanzlichen Invertasen entwickelt wurden (Roitsch et al. (1995) Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analogue and tissue specific expression suggest a role in sink source regulation. Plant Physiol. 108, 285-294).

Die Sequenz von OIN 3 ist hierin als SEQ ID No. 4 bezeichnet.

Die Sequenz von OIN 4 ist hierin als SEQ ID No. 5 bezeichnet.

Die solchermaßen gefundene Sequenz der extrazellulären Invertase NIN 77, bzw. das cDNA-Fragment, wird hierin als SEQ ID No. 6 bezeichnet.

Das cDNA-Fragment von NIN 77 wurde alsdann verwendet, um eine genomische Bank von Tabak im Phagen Lambda gt 10 zu screenen. Die dabei erhaltenen positiven Klone wurden erneut unter Verwendung des Oligonucleotids ONT 4 gescreent. Die Sequenz von ONT 4 wird hierin als SEQ ID No. 7 bezeichnet

Sodann wurde aus einem Lambda-Klon zwei überlappende Fragmente in pUC19-Vektoren subkloniert und anschließend die Klone sequenziert. Klon pNDG8.3 enthält den vollständigen Promotorbereich und den 5'-Bereich des Strukturgens, Klon pNDG8.1 enthält den 3' Bereich des Promotors und das vollständige Strukturgen. Dabei wurde festgestellt, daß das klonierte Gen für eine Invertase kodiert, die verschieden ist von der extrazellulären Invertase NIN 77. Diese neue extrazelluläre Invertase wurde als NIN 88 bezeichnet.

Die genomische Sequenz von NIN 88 findet sich hierin als Fig. 15 und als SEQ ID. No. 15.

Beispiel 3: Expressionsanalyse der extrazellulären Invertase NIN 88

Die im Ergebnis in Fig. 2 dargestellte Expressionsanalyse mittels Northern Blot ergab, daß die mRNA spezifisch in den Antheren lokalisiert ist. Um die Lokalisation weiter zu spezifizieren, wurde eine Immunolokalisation in Antherenquerschnitten unter Verwendung von Antikörpern durchgeführt, die gegen ein Fusionsprotein von NIN 88 und Maltosebindeprotein gerichtet sind. Das Ergebnis ist in Fig. 3 dargestellt.

Die extrazelluläre Invertase NIN 88 ist zunächst in Zellen des Endotheciums und des Tapetums lokalisiert und in einem späteren Entwicklungsstadium in den sich entwickelnden Pollen, die einen kontinuierlichen Anstieg der Aktivität der extrazellulären Invertase zeigen. Die zeitliche Abfolge der Expression von NIN 88 ergibt wird in den Teilen A bis C von Fig. 3 veranschaulicht. Teil A von Fig. 3 zeigt die spezifische Lokalisation des NIN 88 – Proteins im Tapetum in einem Antheren-Querschnitt. Der Nachweis erfolgt dabei durch Immunolokalisation, die einen dunklen Rand an der hellen bohnenförmigen Struktur im Inneren ergibt. Im Laufe der Pollenentwicklung kann sodann NIN 88 in Tetraden (Fig. 3, Teil C) und danach in den Pollen (Fig. 3, Teil B) in einem Antherenquerschnitt unter Verwendung des oben beschriebenen Antiserums dargestellt werden, wobei der Nachweis bei den Tetraden in Form dunkel gefärbter ovaler und der Nachweis bei den Pollen in Form runder Strukturen im Inneren der angeschnittenen hellen bohnenförmigen Struktur erfolgt.

Aufgrund dieser Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, daß der die Expression der extrazellulären Invertase NIN 88 von Tabak steuernde Promotor sowohl gewebespezifisch (Pollen und Tapetum) als auch entwicklungsstadienspezifisch ist.

Beispiel 4: Herstellung von Nukleinsäurekonstrukten, die den Promotor von NIN 88 umfassen.

Bei der in Beispiel 2 beschriebenen Klonierung des NIN88 Gens wurde der Promotor, als Teil des Gens (zusammengesetzt aus Promotor (und anderen Steuerelementen) und Strukturgen) mit kloniert. In die Beschreibung des Beispiel Nr. 2 wurde die Bezeichnung des Plamids (pNDG8.3), das den Promotor und den für das NIN88 Antisense-Konstrukt verwendeten Teil des NIN88 Gens enthält, mit aufgenommen.

Die in SEQ ID No. 1 dargestellte Sequenz stellt ein etwa 3 kb großes Fragment des NIN 88 Promotors dar. Die Sequenz nach SEQ ID No. 1 ist als Promotor aktiv und umfaßt mehrere Pollenexpressionsspezifische cis-aktive Elemente nach Madison et al (1999); Plant. Mol. Biol. 41, S. 741 – 751:

TGTGGTT	Twell et al., 1991
GAARTTGTGA	Twell et al., 1991
GAAA(NNNNNN)TCCACCATA	Bate und Twell, 1998
AAATGA	Weterings et al., 1995
Lange poly-Adenosin-reiche Bereiche in der 5'UTR	Bate et al., 1996

Die Sequenz nach SEQ. ID No.1 ist, ergänzt um ca. 1 kb am 5'-Ende und mit den obigen Annotierungen versehen, in Fig. 5 dargestellt. Die verglichen mit SEQ ID No. 1 zusätzlichen 1 kb von SEQ ID No. 2 befinden sich vor dem 5'-Ende der SEQ ID No. 1.

Die Sequenz nach SEQ ID No. 1 wurde als Promotor (hierin auch als NIN 88-Promotor bezeichnet) an verschiedene andere codierende Sequenzen fusioniert, wie dargestellt in Fig. 6. Die Sequenzen wurden entweder in sense-Orientierung oder in anti-sense-Orientierung fusioniert. Bei der sense-Orientierung kommt es zur Bildung von mRNA und damit zu einem Translationsprodukt, bei anti-sense-Orientierung zu Bildung von antisense-Nukleinsäure, die mit sense-Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt und dabei die Bildung eines Translationsproduktes verhindert. Bei den verschiedenen Konstrukten bedeutet:

GUS	beta-Glucuronidase
NIN 88	extrazelluläre Invertase NIN 88 aus Tabak
CIN 1	extrazelluläre Invertase CIN1 aus <i>Chenopodium rubrum</i> , EMBL Acc. No. X81792
Ntβfruc1	extrazelluläre Invertase Ntβfruc1 aus Tabak, EMBL Acc. No. X81834

Invertase-Inhibitor

der von Rausch (Greiner, S. et al. (1998) Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Plant Physiol. 116, pp. 733-742] beschriebene apoplastische Invertase-Inhibitor Nt-Inh1 aus Tabak

Beispiel 4.1: Konstrukt Promotor-GUS (sense)

Bei diesem Konstrukt wurde das etwa 3 kb große Fragment von SEQ ID No. 1 als NIN 88 – Promotor mit dem beta-Glucuronidase-Gen als Reportergen in einem Derivat des Pflanzentransformationsvektors pBI101 in sense-Orientierung fusioniert und zur Transformation von Tabak (*Nicotiana tabacum* cv (=cultivar, Sorte). Xanthi und Samsun NN) verwendet. Die Klonierungsstrategie ist in Beispiel 4.3 beschrieben. Der Nachweis der Expression des Promotors in Antheren wurde durch histochemischen Nachweis der beta-Glucuronidase-Enzymaktivität an den Geweben von intakten Antheren unter Verwendung des Substrats X-GLUC erbracht. Der Nachweis der Expression des Promotors in Pollen wurde sowohl durch den histochemischen Nachweis der beta-Glucuronidase-Enzymaktivität als auch durch den fluorometrischen Nachweis in Rohextrakten unter Verwendung des Substrats MUG erbracht.

Die Ergebnisse der histochemischen Nachweise sind in Fig. 6 dargestellt.

Teil A von Fig. 6 zeigt die infolge der Expression der beta-Glucuronidase gut histochemisch anfärbbaren Antheren. Teil B zeigt, daß unter dem Einfluß des NIN 88-Promotors die beta-Glucuronidase auch in den Pollen nachgewiesen werden kann, während in Teil C gezeigte Pollen von wt Pflanzen, d.h. Pflanzen vom Wildtyp, nicht angefärbt werden.

Beispiel 4.2 Verwendung des Konstruktes Promotor –GUS (sense) zur Transformation von Tomate und *Arabidopsis thaliana*

Das in Beispiel 4.1 beschriebene Konstrukt Promotor – GUS (sense) wurde auch zur Transformation von Tomaten (*Lycopersicon peruvianum*) verwendet. Auch in diesem Fall konnte der Nachweis der spezifischen Expression des Promotors in Antheren und Pollen durch den histochemischen Nachweis der beta-Glucuronidase-Enzymaktivität erbracht werden. Fig. 11 zeigt, daß GUS Aktivität spezifisch in den Antheren der transformierten Linie LP1-8, nicht aber in den Antheren einer wt Pflanze nachweisbar ist.

Die Pollen sind nur im Falle der transformierten Tomate (LP 1-8), nicht jedoch im Falle des Wildtyps, histochemisch infolge der Anwesenheit von beta-Glucuronidase-Aktivität färbbar.

Das besagte Konstrukt wurde auch verwendet, um *Arabidopsis thaliana* zu transformieren. Wie im Falle von *Lyopersicon* war ein gewebe- und entwicklungsstadienspezifisches Expressionsmuster des Reportergens unter dem Einfluß des NIN 88-Promotors festzustellen.

Aus diesen Transformationsexperimenten ergibt sich, daß die erfindungsgemäßen Promotoren und die sie verwendenden Konstrukte nicht auf eine Pflanzenart oder Pflanzensorte hinsichtlich ihrer Anwendung beschränkt sind, sondern vielmehr universell für eine jede Pflanze eingesetzt werden können.

Beispiel 4.3: Konstrukt Promotor - NIN 88 (antisense)

Wie im Falle des Beispiels 4.1 wurde der NIN 88 –Promotor verwendet und daran in antisense-Orientierung die Sequenz für das Fragment der NIN 88 (entspricht SEQ ID No. 6) fusioniert. Dieses Konstrukt wird hierin als SEQ ID No. 8 und bezeichnet und ist in Fig. 16 dargestellt.

Beispiel 4.3.1: Die Konstruktion des Konstruktes gemäß SEQ ID. No 8 verläuft unter Zwischenschaltung des in Beispiel 4.1 beschriebenen Konstrukts Promotor – beta-Glucuronidase wie folgt:

1. Klonierung eines ca. 3 kb des Nin88-Promotor-Fragmentes in den Pflanzenexpressionsvektor pBI101

- Isolierung eines ca. 3 kb großen XhoI-BamHI-Fragments des NIN88-Promotors aus dem Plasmid pNDG8.3
- Linearisierung des Plamids pBI101 mit SalI und BamHI am 5'-Ende des promotorlosen β -Glucuronidasegens
- Ligation des Fragments in den linearisierten Vektor und Transformation in E. coli zur Konstruktion von Plasmid pNPG1

2. Einführung weiterer Restriktionsenzymstellen am 3'-Ende des β -Glucuronidase-Gens

- Linearisierung des Plamids pNPG1 mit SacI am 3'-Ende des promotorlosen β -Glucuronidasegens vor dem Nos-Terminator
- Einführung einer Linkersequenz mit den Restriktionsenzymstellen SacI-XhoI-HpaI-NdeI-SacI mittels der Oligonukleotide NPVC1 (hierin als SEQ ID No. 9 wiedergegeben) und NPVC3 (hierin als SEQ ID No. 10 wiedergegeben) durch Hybridisierung.
- Transformation in E. coli zur Konstruktion von Plasmid pNPG2

3. Einführung der fehlenden 300 bp am 3'-Ende des Nin88-Promotors und Fusion des 5'-Endes der codierenden Sequenz von NIN88, genauer gesagt der ersten 12 Nukleotide, entsprechend 4 Aminosäuren der codierenden Sequenz einschließlich dem Start ATG (Methionin) von NIN 88, mit der codierenden Sequenz des β -Glucuronidasegens

- Amplifikation eines ca. 300 bp Fragmentes aus dem NIN88 Gen durch PCR an pNDG8.3 mit den Primern NPK1 (hierin als SEQ ID No. 11 wiedergegeben) und NPK10 (hierin als SEQ ID No. 12 wiedergegeben) (jeweils mit BamHI Schnittstelle), Restriktionsenzymverdau mit BamHI
- Linearisierung des Plamids pNPG2 mit BamHI am 5'-Ende des promotorlosen β -Glucuronidasegens
- Ligation des Fragments in den linearisierten Vektor und Transformation in E. coli zur Konstruktion von Plasmid pNPG3 (Nin88 Promotor-GUS Fusion)

4. Ersatz des Glucuronidasegens durch eine NIN88 cDNA Sequenz in Antisense-Orientierung

Amplifikation eines ca. 800 bp Fragmentes , das ein Teil von Exon III ist und damit ein Teil der cDNA von NIN 88, aus dem codierenden Bereich des NIN88 Gen durch PCR an pNDG8.3 mit den Primern NPK7 (hierin als SEQ ID No. 13 wiedergegeben) (mit Xho Schnittstelle) und NPK8 (hierin als SEQ ID No. 14 wiedergegeben) ,

Restriktionsenzymverdau mit XhoI

- Ausschneiden des β -Glucuronidasegens aus dem Plamid pNPG3 durch Restriktionsenzymverdau mit SmaI und XhoI und Isolierung des Vektors mit dem NIN88 Promotor und Nos-Terminator
- Ligation des Fragments in den Vektor und Transformation in E. coli zur Konstruktion von Plasmid pNPAN (**Nin88 Promotor - NIN88 Antisense Fusion**)

Dieses Konstrukt kann verwendet werden, um die männlich sterilen Pflanzen der vorliegenden Erfindung zu erzeugen, indem es in eine pflanzliche Zelle mittels bekannter Techniken transformiert wird und die erhaltenen Transformanten zu vollständigen Pflanzen gezüchtet oder regeneriert werden. Der dabei auftretende Wirkmechanismus wurde bereits oben beschrieben. Das Konstrukt nach SEQ ID No.8 wurde zur Transformation von Tabak (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi und Samsun NN) verwendet.

Beispiel 4.3.2: Die unter Verwendung des in Beispiel 4.3.1 beschriebenen Konstruktes (Invertase-Antisense-Konstrukt unter Kontrolle des NIN 88 – Promotors) erhaltenen männlich sterilen Pflanzen wurden sodann charakterisiert.

Der Nachweis der Transformation wurde erbracht durch PCR unter Verwendung des Primers NPK15 (spezifisch für den NIN88 Promotor), hierin als SEQ ID No. 16 bezeichnet, und NPK19 (spezifisch für das NIN88-antisense Konstrukt), hierin als SEQ ID No. 17 bezeichnet.

Die phänotypische Charakterisierung ergab folgendes:

Es trat eine normale Entwicklung der Pflanze insgesamt und insbesondere der Blüten und der Antheren auf. Die Pflanzen, die den stärksten Phänotyp zeigen, sind charakterisiert durch die folgenden Merkmale:

- Nach dem Aufplatzen der Pollensäcke sind deutlich weniger Pollen zu sehen
- Es bilden sich keine normalen Samenkapseln aus
- Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Pollen von männlich sterilen Pflanzen zeigen eine abnorme Gestalt, wie in Fig. 7 dargestellt. („wt“ steht für „Wildtyp“, NT 23-81 bezeichnet eine männlich sterile Pflanze, die unter Verwendung des Konstruktes nach SEQ ID. No 8, wie auch dargestellt in Fig. 16, erzeugt wurde.
- Querschnitte im TEM zeigen, daß die Pollen weitgehend leer sind (Fig. 7)
- Die Keimungsfähigkeit der Pollen beträgt weniger als 1%, wie ersichtlich aus Fig. 8
- Die Stärkeakkumulation ist geringer, wie aus dem Befund einer negativen Stärkefärbung erkennbar (Fig.9).
- Fig. 10 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von Pollen vom Tabakwildtyp und von einer männlich sterilen Pflanze (NT 23-6) (erzeugt unter Verwendung des Konstruktes nach SEQ ID No. 8 und Fig. 16), die diesen Befund stützen und auch zeigen, daß die sterilen Pollen weniger entwickelt sind.
- Die Invertaseaktivität in den Antheren ist normal
- Die Invertaseaktivität in den Pollen ist deutlich reduziert. Dieser Befund in Verbindung mit dem vorhergehenden bestätigt erneut die Gewebespezifität der erfindungsgemäßen Promotoren.
- Die Pollen der erfindungsgemäßen männlich sterilen Pflanzen keimen nicht aus (Fig. 11), sind jedoch vital, wie durch Färbung mit Trypan blue nachgewiesen, und in einem sehr frühen Entwicklungsstadium arretiert mit der Folge, daß sie z.B. der in vitro Embryogenese zugänglich sind.

Beispiel 4.4: Weitere Konstrukte und Transformationen unter Verwendung des NIN 88-Promotors

Ergebnisse der mit den anderen Konstrukten, wie dargestellt in Fig. 4, erhaltenen Linien:

Nachweis der Transformation:

Es wurde jeweils der Primer NPK15 (entsprechend SEQ ID No. 16 (spezifisch für den NIN88 Promotor) und NPK17 (entsprechend SEQ ID No. 18) (CIN1-antisense), NPK 18

(entsprechend SEQ ID No. 19) (Invertase-inhibitor-sense) bzw. NPK20 (entsprechend SEQ ID No. 20) (NTßfruc1-antisense) verwendet.

Phänotyp bezüglich der Keimfähigkeit der Pollen:

CIN1-antisense: Reduktion der Keimfähigkeit der Pollen um bis zu 98%

NTßfruc1-antisense: Reduktion der Keimfähigkeit der Pollen um bis zu 91%

Invertase-inhibitor-sense: Reduktion der Keimfähigkeit der Pollen um bis zu 81%

Beispiel 5: Pollen- und Tapetum-spezifischer Promotor aus Tomate

Ein ca. 750 bp großes Fragment der extrazellulären Invertase Lin7 aus Tomate wurde durch PCR mit den Primern OIN3 und OIN4 an genomischer DNA kloniert. Die Analyse der Verteilung der mRNA ergab eine Antheren-spezifische Expression. Unter Verwendung des kommerziellen Genome Walk Kit (Fa. Strategene) wurde ausgehend von der Lin7 Teilsequenz ein Promtor mit einer vergleichbaren Gewebe- und Entwicklungsstadiumspezifität auch aus der Tomate kloniert. Die Sequenz dieses Promotors ist hierin als SEQ ID No. 3 wiedergegeben.

Wie aus Fig. 13 ersichtlich, wird die unter der Kontrolle des Promotors nach SEQ ID No. 3 stehende extrazelluläre Invertase LIN 7 aus der Tomate ebenfalls in den Staubbeuteln der Tomate exprimiert. Die genauere Lokalisation von LIN 7, genauer die Verteilung der mRNA von Lin 7, ist in Fig. 14 gezeigt und bestätigt die Gewebespezifität des Promotors von LIN 7, d.h. des Promotors nach SEQ ID No. 3: Die Expression erfolgt sowohl im Tapetum als auch in den Pollen. Die Bezeichnungen „sense“ und „antisense“ in Fig. 14 bezeichnen hier eine Negativ- und Positivkontrolle, da man zum spezifischen Nachweis einer mRNA in Gewebeschnitten durch in-situ Hybridisierung eine komplementäre, hybridisierende, einzelsträngige antisense RNA-Sonde verwendet. Eine sense-Sonde, die nicht hybridisieren kann, da sie eine identische Basenzusammensetzung hat, wird als Negativkontrolle eingesetzt.

In Fig. 17 ist die Sequenz von LIN 7 mit Annotationen gezeigt, die SEQ ID No. 3 entspricht.

Eine Sequenzanalyse von LIN 7 ergab, daß dieser Promotor eine Reihe von cis-wirkenden Elementen trägt, die Pollenspezifisch sind:

TGTGGT

Twell et al., 1991

GAAANNNNNNTNNANNATN

Bate and Twell, 1998

NANANTGTGA

Twell et al. 1991

GTCAAAA

Zou et al. 1994

Lange Polyadenosin-reiche Bereiche in den 5'-UTR Bate et al. 1996

Die CAAT-box, TATA-box und das Start-Codon ATG sind in Fettdruck dargestellt.

Die in der vorstehenden Beschreibung, in der Zeichnung sowie in den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Nukleinsäuresequenz codierend für einen Promotor, wobei der Promotor sowohl tapetumspezifisch als auch pollenspezifisch ist.
2. Nukleinsäuresequenz codierend für einen Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz einen Bereich von mindestens etwa 900 Nukleotiden stromaufwärts der TATA-box der in SEQ ID No.1 dargestellten Sequenz umfaßt.
3. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz einen Bereich von mindestens etwa 1000 Nukleotiden stromaufwärts der TATA-box der in SEQ ID No.1 dargestellten Sequenz umfaßt.
4. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz einen Bereich von mindestens etwa 1500 Nukleotiden stromaufwärts der TATA-box der in SEQ ID No.1 dargestellten Sequenz umfaßt.
5. Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Sequenz umfaßt.
6. Nukleinsäuresequenz codierend für einen Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID No.2 dargestellten Sequenz umfaßt.
7. Nukleinsäuresequenz codierend für einen Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID No.3 dargestellten Sequenz umfaßt.
8. Expressionssystem umfassend mindestens eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 7.
9. Expressionssystem nach Anspruch 8 weiterhin umfassend mindestens einen Terminator und/oder einen Linker.

10. Nukleinsäurekonstrukt umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und zumindest einen Teil einer exprimierbaren Nukleinsäuresequenz.
11. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil der exprimierbaren Nukleinsäuresequenz oder die vollständige exprimierbare Sequenz mit der Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in sense-Richtung verbunden ist.
12. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die exprimierbare Nukleinsäure für eine Invertase codiert.
13. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil der Nukleinsäuresequenz einer Invertase oder die vollständige Sequenz einer Invertase mit der Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in anti- sense-Richtung verbunden ist.
14. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Invertase eine solche ist, die in einer Struktur vorhanden ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Antheren, Tapetum, Pollenvorläuferzellen und Pollen umfaßt.
15. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Invertase aus dem Organismus stammt, in den oder in dessen Zellen das Nukleinsäurekonstrukt eingeführt werden soll, und insbesondere aus der Pflanzengruppe stammt, zu der die Spezies gehört, in die das Nukleinsäurekonstrukt eingeführt werden soll.
16. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nutzpflanzen, Zierpflanzen und Arzneipflanzen umfaßt.
17. Vektor umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 8 bis 9 und/oder ein Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 10 bis 16.

18. Zelle, insbesondere Pflanzenzelle, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 8 bis 10 und/oder ein Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 10 bis 16 und/oder einen Vektor nach Anspruch 17.
19. Zelle, insbesondere nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die ein Promotor ist, und eine Nukleinsäure, die für einen Inhibitor einer Invertase codiert, umfaßt, wobei der Promotor die Expression des Inhibitors steuert.
20. Zelle nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe, die Pollenzellen, Pollenvorläuferzellen und Zellen des Tapetums umfaßt.
21. Zelle nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine arretierte Pollenzelle ist.
22. Pflanze umfassend eine Zelle nach einem der Ansprüche 18 bis 21.
23. Pflanze nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nutzpflanzen, Zierpflanzen und Arzneipflanzen umfaßt, bevorzugterweise ausgewählt ist aus der Gruppe, die Reis, Mais, Kartoffeln, Tomaten, Raps, Soja und Zuckerrüben umfaßt.
24. Pflanze nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze eine männlich sterile Pflanze ist und zumindest eine weitere Änderung ihres Genotyps aufweist, insbesondere eine gentechnologisch bedingte Veränderung.
25. Samen gewonnen von einer Pflanze nach einem der Ansprüche 22 bis 24.
26. Hybridsamen dadurch erhältlich, daß eine männlich sterile Pflanze nach einem der Ansprüche 22 bis 24 mit einer anderen männlich fertilen Pflanze gekreuzt wird und aus der solchermaßen entstandenen Filialgeneration der Hybridsamen gewonnen wird.

27. Verfahren zur Herstellung männlicher steriler Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 16 in eine Zelle, insbesondere in eine Pflanzenzelle, eingebracht wird und ausgehend von dieser Zelle eine Pflanze erzeugt wird.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe, die Nutzpflanzen, Zierpflanzen und Arzneipflanzen umfaßt, bevorzugterweise ausgewählt ist aus der Gruppe, die Reis, Mais, Kartoffeln, Tomaten, Raps, Soja und Zuckerrüben umfaßt.
29. Verwendung eines Nukleinsäurekonstruktes nach einem der Ansprüche 12 bis 16 zur Herstellung steriler männlicher Pflanzen.
30. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Expression einer Nukleinsäuresequenz.
31. Restorer-Pflanze, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Zelle, bevorzugterweise in der Mehrzahl ihrer Zellen, eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Promotor und eine für eine weitere Invertase codierende Nukleinsäure umfaßt, die von diesem Promotor gesteuert wird, wobei die weitere Invertase verschieden ist von der zelleigenen Invertase.
32. Restorer-Pflanze, bevorzugterweise nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Zelle, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Promotor und eine für ein Saccharose-Transportsystem codierende Nukleinsäure umfaßt, die von diesem Promotor gesteuert wird.
33. Restorer-Pflanze nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Zelle, bevorzugterweise in der Mehrzahl ihrer Zellen, weiterhin eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Promotor und eine für Saccharose-Synthase und/oder cytoplasmatisch exprimierte Invertase codierende Nukleinsäure umfaßt, deren Expression von dem Promotor gesteuert wird.

34. Pflanze, dadurch gekennzeichnet, sie in mindestens einer Zelle, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, ein Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 16 umfaßt und die Zelle(n) weiterhin eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Promotor und eine für eine weitere Invertase codierende Nukleinsäure umfaßt, die von diesem Promotor gesteuert wird, wobei die weitere Invertase verschieden ist von der zelleigenen Invertase.
35. Pflanze, bevorzugterweise nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß sie in mindestens einer Zelle, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, ein Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 16 umfaßt und die Zelle(n) weiterhin eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Promotor und eine für ein Saccharose-Transportsystem codierende Nukleinsäure umfaßt, die von diesem Promotor gesteuert wird.
36. Pflanze nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß sie in mindestens einer Zelle, bevorzugt in der Mehrzahl ihrer Zellen, ein Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 16 umfaßt und die Zelle(n) weiterhin eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Promotor und eine für Saccharose-Synthase und/oder cytoplasmatisch exprimierte Invertase codierende Nukleinsäure umfaßt, deren Expression von dem Promotor gesteuert wird.
37. Pflanze nach einem der Ansprüche 31 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere, von der zelleigenen Invertase verschiedene Invertase aus gewählt ist aus der Gruppe von Invertasen, die Invertase(n) von *Saccharomyces cerevisiae* und Invertase(n) von *Zymomonas mobilis* umfaßt.
38. Pflanze nach einem der Ansprüche 33 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Saccharose-Synthase heterologen oder homologen Ursprungs ist.
39. Pflanze nach einem der Ansprüche 34 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß die cytoplasmatisch exprimierte Invertase homologen oder heterologen Ursprungs ist.

40. Pflanze nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß die cytoplasmatisch exprimierte Invertase heterologen Ursprungs ist und bevorzugterweise ausgewählt ist aus der Gruppe von Invertasen, die Invertase(n) von *Saccharomyces cerevisiae* und Invertase(n) von *Zymomonas mobilis* umfaßt.
41. Samen gewonnen von einer Pflanze nach einem der Ansprüche 31 bis 40.
42. Verwendung der Samen nach einem der vorangehenden Ansprüche für die in vitro Embryogenese von haploiden oder diploiden oder doppelt diploiden Pflanzen.
43. Frucht, insbesondere samenlose Frucht, gewonnen von einer Pflanze nach einem der Ansprüche 22 bis 24.
44. Frucht, gewonnen von einer Pflanze nach einem der Ansprüche 31 bis 40.
45. Verfahren zur Klonierung von Promotoren, die funktionell homolog sind zu einem der Promotoren nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- c) Kloniere von Antheren-spezifischer Invertase cDNA durch RT-PCR an mRNA aus Antheren, insbesondere unter Verwendung der Oligonukleotide OIN3 und OIN4
 - d) Klonieren der entsprechenden Promotoren